PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTRAL PROTEIN IMMOBILIZED CHIP FOR DETECTING HERBICIDE

Publication number: JP2001083155 (A)

Publication date:

2001-03-30

Also published as:

Inventor(s):

MIYAKE ATSUSHI; NAKAMURA CHIKASHI +

Applicant(s):

AGENCY IND SCIENCE TECHN; MIYAKE ATSUSHI;

NAKAMURA CHIKASHI +

Classification:

- international:

G01N21/27; G01N33/15; G01N33/53; G01N33/543; G01N21/25;

G01N33/15; G01N33/53; G01N33/543; (IPC1-7): G01N21/27;

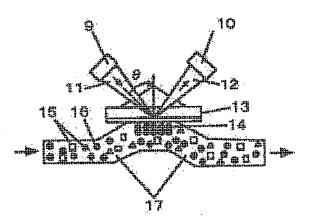
G01N33/15; G01N33/543

- European:

Application number: JP19990258029 19990910 Priority number(s): JP19990258029 19990910

Abstract of JP 2001083155 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure a triazine herbicide by using an immobilized photosynthetic reaction central protein with a histridine tag at a chip substrate. SOLUTION: In a measuring chip, a photosynthetic reaction central protein with a histridine tag is immobilized to a chip substrate. The measuring chip is mounted on a surface plasmon resonance measuring device (SPR) and can be used to measure a triazine herbicide. First, the chip is mounted on the SPR measuring device. That is, the chip 13 is installed so that a transparent substrate is disposed above. Then, a sample liquid containing an admixture substance 15 and a substance 16 to be measured is fed through a channel 17.; Then, a monochromatic light is irradiated from a light source 9 toward a transparent substrate of the chip 13 (incident light 11), and a reflected light 12 of a metal film provided at the chip 13 is incident to a detector 10. The detector 10 can detect an intensity of the reflected light 12.



Data supplied from the espacenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出廣公開番号

特開2001-83155 (P2001-83155A)

平成13年3月30日(2001.3.30)

社団法人日本化学会発行の「日本化学会第76春季年会 特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年3月15日 1999年講演予稿集▲ⅠⅠ▼』に発表 (22) 出版日 (21)出願番号 (51) Int (1.1 G01N 33/543 33/15 21/27 特顯平11-258029 平成11年9月10日(1999.9.10) 5 9 5 機則記号 G01N (71) 出職人 (71)出魔人 (74)上記1名の指定代理人 220000415 (71)出題人 000001144 ŦI 医检糖水 有 33/543 33/15 21/27599128837 599128826 院 産業技術融合領域研究所内 川光 革 東京都千代田区蔵が翌1丁目3番1号 **茨城県つくば市東1丁目1番4** 工業技術院産業技術融合領域研究所長 工業技術院長 炭城県つくば市東1丁目1番4 工業技術 精求項の数5 OL (全 19 頁) 5 9 5 G ゲーマコート・(参考) 26059 現然 耳 ご 続く 工業技術

(54) 【発明の名称】 除草剤検出のための光合成反応中心タンパク質固定化チップ

(修正有)

質固定化チップの提供。 【課題】 除草剤検出のための光合成反応中心タンパク

る表面プラズモン共鳴測定川チップ及びそれを川いてア 反応中心タンパク質が固定化されていることを特徴とす トラジン等のトリアジン系除草剤を測定する方法。 【解決手段】 チップ基板にヒスチジンタグ付き光合成

【特許請求の範囲】

面プラズモン共鳴測定用チップ。 【請求項2】ヒスチジンタグが、光合成反応中心タンパ

ク質のHサブユニットに結合してなるものである請求項 1 記載の表面プラズモン共鳴測定用チップ。

ラズモン共鳴測定用チップの製造方法。 **応中心タンパク質を国定化することを特徴とする表面プ** 【請求項4】チップ基板にヒスチジンタグ付き光合成反 【請求項3】チップ基板にヒスチジンタグ付き光合成反

測定用チップを用いる、トリアジン系除草剤の測定方 応中心タンパク質を固定化してなる表面プラズモン共鳴

求項 4 記載の測定方法。 【川求項5】トリアジン系除心剤がアトラジンである出

[1000] 【発明の詳細な説明】

の測定方法に関する。 造方法及び该測追用チップを用いるトリアジン系除作剤 表面プラズモン共鳴測定用チップ、該測定用チップの製 チジンタグ付き光合成反応中心タンパク質を固定化した 【発明の属する技術分野】本発明は、チップ基板にヒス 23

では、エンザイムイムノアッセイやラジオイムノアッセ 沈降反応測定法などが開発されているが、これらの方法 セイや寒天ゲル内で沈降線を形成させて測定するゲル内 をレーザ光線の散乱により測定するレーザーイスノアッ 要としないアッセイ法として、目的物質に結合した抗体 要とするなどの煩雑さがあった。そこで、標識物質を必 を容易且つ高感度に測定できる反面、酵素、放射性物 反応を利用した測定法は、臨床検査等に広範囲に利用さ ために様々な方法が開発されてきた。なかでも、エンザ イなどに比べ、高感度な測定は困難であった。 質、蛍光物質、発光物質、金属等で標識された物質を必 れている。しかしながら、これらの測定法は、二的物質 イムイムノアッセイやラジオイムノアッセイなどの免疫 【従来の技術】これまで、検体中の微量物質を測定する

孔性材料 3 の表面に、11的物質と結合する酵素、抗体な る。測定用チップは一般的に、図1に示すような構造を 識別素子)が固定化された測定用チップが装着されてい 一部分に、目的物質と特異的に結合するリガンド(分子 11,620-627]。この測定装置は、物質を感知するセンサ 装置が開発された[Jonsson, U. (1991) BioTechniques 共鳴(SPR:surface plasmon resonance)を利用した測定 的物質を高感度に検出することのできる表面プラズモン どのリガンド4が担持又は固定されている。ここで、使 属膜2の上に、多孔性材料3が形成されており、この多 有している。すなわち、ガラス基板1上に成膜された金 【0003】最近、標識物質を必要とすることなく、目 40

8

特開2001-83155

製造することが可能である。 用するリガンドを測定対象物質に合わせて置き換えるこ とによって、種々の表面プラズモン共鳴測定用チップを

5 **通常より共鳴シグナルが小さいため、直接測定すること** が、アトラジンは、分子量が215.5ダルトンと小さく、 体を分子識別素子として固定化したものが報告されてい 剤の一つであるアトラジン測定用として抗アトラジン抗 いる。また、トリアジン系除草剤を測定することができ 8]、心筋梗塞マーカーを測定するための表面プラズモン 共鳴測定用チップ[特開平11-211725]などが開発されて めの表面プラズモン共鳴測定用チップ [特開平11-21172 【0004】現在までに、ヘモグロビンAIを測定するた

は困難とされている [特開平10-267834]。

[0005]

的とする。 いたトリアジン系除草剤の測定方法を提供することを目 鳴測定用チップ、該チップの製造方法及び該チップを用 系除草剤を直接測定することができる表面プラズモン共 【発明が解決しようとする課題】本発明は、トリアジン

[0006]

反応中心タンパク質を固定化したものを用いることによ チップとして、チップ基板にヒスチジンタグ付き光合成 共鳴測定装置によるアトラジンの測定において、測定用 を解決するため鋭意研究を行った結果、表面プラズモン 発明を完成するに至った。 って、アトラジンを高感度に測定することに成功し、 【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

ある。ここで、ヒスチジンタグは、光合成反応中心タン ることを特徴とする表面プラズモン共鳴測定用チップで ジンタグ付き光合成反応中心タンパク質を固定化してな パク質のHサブユニットに結合したものであり得る。 【0007】すなわち、本/別川は、チップ 小板にヒスチ

除草剤(例えばアトラジン)の測定方法である。以下、本 面プラズモン共鳴測定用チップを用いる、トリアジン系 タグ付き光合成反応中心タンパク質を固定化してなる表 法である。さらに、本発明は、チップ基板にヒスチジン を特徴とする表面プラズモン共鳴測定用チップの製造方 ンタグ付き光合成反応中心タンパク質を固定化すること 【0008】さらに、本発明は、チップ基板にヒスチジ

[00009]

発明を詳細に説明する。

用チップ(測定用チップともいう)は、チップ基板にヒス チジンタグ付き光合成反応中心タンパク質が固定化され **測定に用いることができるチップをいう。** 測定装置ともいう)に装着して、トリアジン系除草剤の ているものであって、表面プラズモン共鳴測定装置(SPR 【発明の実施の形態】本発明の表面プラズモン共鳴瀕定

【0010】1、ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タ

<u>ශ</u>

タグが結合したものをいう。 を構成する少なくとも1つのサブユニットにヒスチジン は、光合成反応中心タンパク質(RCタンパク質ともいう) う)は、以下のようにして調製することができる。ここ 応中心タンパク質(ヒスチジンタグRCタンパク質ともい として川いることができるヒスチジンタグ付き光合成反 本発明の表面プラズモン共鳴測定用チップ用のリガンド ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパク質と

【0011】(1)ロドバクター・スフェロイデス染色体D

は、ASY培地やYCC培地を用いて、50~100時間液体培養 obacter sphaeroides)など)が挙げられる。この細菌 岗(紅色光合成細菌ロドバクター・スフェロイデス(Rhod あれば特に限定されず、例えばロドバクターに属する細 用し得る光合成反応中心タンパク質を供給し得るもので パク質の供給源としては、トリアジン系除草剤と相互作 本発明において用いることができる光合成反応中心タン

り、その人手は容易である。 DSM (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zei デスは、ATCC (American Type Culture Collection) や において用いることができるロドバクター・スフェロイ することにより増殖させることができる。なお、本発明 lkulturen GmbH)などの微生物保存機関に保存されてお 23

れる手法により行うことができる。例えば、培養によっ を調製することができる。 分解後、アルコール沈殿させることにより、染色体DNA る。次いた、リボメクレアーが処理などによってRNAを よる化学的処理法によって細胞を破壊し、核酸を抽出す 懸濁し、次いで、界面活性剤(例えばSDS、CTAB)などに て得られた菌体を、TEバッファーなどの適当な緩衝液に 【0012】細菌からの染色体DNAの調製は、通常行わ છ

【0013】(2)ヒスチジンタグMタンパク質発現ベク

鋳型として、塩基配列データベース(例えばGenBankな ttggtgtgactgcttt-3'(配列番号9)、アンチセンスプラ Aを増幅する場合、センスプライマーについては5'-atgg ることができるプライマーとしては、HサブユニットIVI chain reaction)によって増幅する。ここで、PCRに用い マーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR:plymerase 塩基配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチドプライ ど)から取り寄せた前記サブユニットをコードするDNAの ードするDNAを、上記(1)において得られた染色体DNAを H、L、Mの3個のサブユニット(図2)のいずれかをコ クターを構築する場合、まず、該タンパク質を構成する うにして構築することができる。すなわち、例えば、ロ ヒスチジンタグRCタンパク質発現ベクターは、以下のよ プライマーについては5' -atggcactgctcagcttcga-3'(配 号10)を、LサブユニットDNAを抑幅する場合、センス イマーについては5'-tcaggcgtattcggccagca-3'(配列番 ドバクター・スフェロイデス由来のRCタンパク質浴吗べ

> スプライマーについては5'-tcagttcagcggcgccatgc-3' atggctgagtatcagaacat-3'(配列番号13)、アンチセン agccattgatgcctcccg-3'(配列番号12)、Mサプユニッ って行うことができる。 い。合成は、DNA合成機(例えばABI社製モデル391)によ おいてはこれらのプライマーに限定されるものではな 列番号11)、アンチセンスプライマーについては5'-ta (配列番号14)を用いることができる。但し、本発明に トDMAを増幅する場合、センスプライマーについては5'

一等)を用いて行うことができる。 決定機(例えばPERKIN-ELMER社製373A DNAシークエンサ の方法により行うことができるが、通常は自動塩基配列 学修飾法、ジデオキシヌクレオチド劉終結法などの公知 できる。塩基配列の決定は、マクサム-ギルバートの化 ニング後、塩基配列を決定することによって行うことが 片であることの確認は、得られた断片をpBlueScriptSK (+) (STRATAGENE社製)等の適当なベクターにサブクロー 【0014】PCRによって増幅された断片が目的のDNA的

・スフェロイデス由来の光合成反応中心タンパク質につ 伝子の塩基配列を、配列番号8にMサブユニットのアミ 酸配列を、配列番号7にMサブユニットをコードする遺 子の塩基配列を、配列番号6にLサブユニットのアミノ 配列を、配列番号 5 に L サブユニットをコードする遺伝 の塩基配列を、配列番号2にHサブユニットのアミノ機 いて、配列番号1にHサブユニットをコードする遺伝子 ノ酸配列を示した。 【0015】なお、本発明において用いたロドバクター

0]など、大腸菌宿主用にはpBR322、pBR325、pUC18、pUC 19、pUC118、pUC119など、枯草菌宿主用にはpUB110、pT P5など、酵母宿主用にはYEp13、YEp24、YCp50、Y1p30な ロモーターを付加したpCHB500HP[Benning, C. and C. D. Trollinger. (1988) Gene 70,191-197]や、これにプ は、プロモーター、ターミネーターなどの他、所望によ ターに組み込むことが必要である。そこで、ベクターに に当っては、その遺伝子が転写・翻訳されるようにべり どが挙げられる。RCタンパク質をコードするDNAの挿入 pRK415 [Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and る。例えば、ロドバクター・スフェロイデス宿主用には ベクターとしては、使用する宿主に応じて、該宿主中で 適当なベクターに連続する。ここで用いることができる 複製可能な様々なプラスミドDMAを用いることができ 【0016】次いで、RCタンパク質をコードするDNAを Somerville (1992) J. Bacteriology 174, 2352-236 SD配列などを連結することができる。 エンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカ

プチドをいう。改変は、コドンCACをいくつか導入した ヒスチジンが2~10個、好ましへは6~7個の結合したべ ドするDNAを改変する。ここで、ヒスチジンタグとは、 【0017】次に、RCタンパク質にヒスチジンタグが結合したものをコードするように前記RCタンパク質をコー

> を選択する。こうして人工的に組み換えヒスチジンコド イトを末端に有し、構造遺伝子C末端を含む遺伝子領域 増幅に適した長さを持ち、組み換えに適した制限酵素サ マーを川いて増削する。遺伝子改変に川いる領域はPCR **挿入変異遺伝子を合成し、これを鋳型としてPCRプライ** ンを有した遺伝子を部分的に合成する。

Aの塩基配列を配列番号 3 に、アミノ酸配列を配列番号 現プラスミドは構築される。なお、本発明において構築 ネイティブなHサブユニットをコードするDNAのC末端 配列番号18に示した。次いで、得られたDNA断片を、 ライマーを配列番号17に、アンチセンスプライマーを ることができる。ここで、用いることができるセンスプ としてPCRを行うことによって、C末端にヒスチジンタ 二本鎖DNAを鋳型、各鎖の5' 末端側の配列をプライマー を鋳型として、3'側を延長合成する。さらに、得られた 列番号16に示した。次いで、センス鎖側及びアンチセ 配列を配列番号15に、アンチセンス鎖側のDNA鎖を配 本発別において化学合成したセンス鋭側のDNA紙の塩具 及びアンチセンス鎖側のDNA鎖を化学合成する。なお、 ットのC末端コード領域を含む約100塩基のセンス鎖側 れるように改変した塩基配列を有し且つ互いにアニーリ ず、HサブユニットのC末端にヒスチジンタグが付加さ DNAは、以下のようにして調製することができる。 C末端に6個のヒスチジンが結合したものをコードする 構造遺伝子が得られる。これを適当な発現ベクターに導 領域コード部分と置換することによって、ヒスチジンタ グが付加されたC末端側領域をコードするDNA断片を得 ンス鎖側のDNA鎖をアニーリング後、互いの一本鎖部分 ングし得る相補的領域を3'末端側に有する、Hサブユニ 4に示した。 入することでヒスチジンタグを付けたHサブユニット発 グが導入されたHサブユニットをコードするDNAを含む したヒスチジンタグ付きHサブユニットをコードするJM 【0018】例えば、KCタンパク質のHサプユニットの

【0019】(3)形質転換体の作製

は、光合成反応中心を発現できるものであれば特に限定 することにより得ることができる。ここで、宿主として 用の形質転換体は、上記(1)において得られた発現ベク には同種の光合成細菌を用いることが好ましい。 されるものではないが、完全なRC複合体を形成するため ターを、該タンパク質が発現し得るように宿主中に導入 本発明において川いるヒスチジンタグRCタンパク質発現

む発現ベクターのみを宿主に導入するだけで、ヒスチジ 結されるように改変したサブユニットコード遺伝子を含 **鑑覧中に発現させることができる。ここで、野生型のロ** る遺伝子を元来、有しているため、ヒスチジンタグが連 て用いる場合には、該徴生物はRCタンパク質をコードす ンタグ付きサブユニットを含むRCタンパク質を、該宿主 ドバクター・スフェロイデスを宿主として用いた場合に 【0020】ロドバクター・スフェロイデスを宿主とし

3

特開2001-83155

は、ヒスチジンタグ付きサブユニットを含むftなンパク 質とヒスチジンタグが付加していない元々のタイプのftで

n, S. (1989) J. Bacteriology 171, 436-446] に従っ 中に発現させることができる。例えば、Hサブユニット いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。 定されるものではない。例えば、カルシウムイオンを用 法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限 ることもできる。光合成細菌への発現ベクターの導入方 スから構築することもできるし、Sockettらから入手す て、ATCCに寄託されているロドバクター・スフェロイデ tt, R. E., Donohue, T. J., Varga, A. R., and Kapla 場合には、Hサブユニット欠損株PUBA1を用いることが にヒスチジンタグが結合したRCタンパク質を発現させる ジンタグ付き光合成反応中心タンパク質のみを衍主細胞 イデスを宿主として用いることによって、目的のヒスチ 繋雑になり得る。そこで、ヒスチジンタグを付加しよう 含む化タンパク質の発現効率が低かったり、精製工程が されるため、目的のヒスチジンタグ付きサブユニットを タンパク質の2種類のRCタンパク質が同一宿主中に発現 できる。該欠損株は、Sockettらの手法 [文献名:Socke とするサブユニットを欠損したロドバクター・スフェロ 【0021】(4)ヒスチジンタグ配タンパク質の生産及

精製することができる。 いるものをいう。該タンパク質は、前記2において得ら るいずれかのサブユニットにヒスチジンタグが結合して ヒスチジンタグRCタンパク質は、RCタンパク質を構成す れた形質転換体の培養物から、以下のようにして生産・

39 アクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。 体が誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質 一で形質極換した微生物を培養するときにはインドール シド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクタ 養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノ ターを用いた発現ベクターで形質転換された微生物を培 ーサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモー 転換されたものである場合には、必要に応じてインデュ 【0022】形質情数体の特徴において、その形質情数

50 の破砕は、超音波、フレンチプレス、ガラスビーズを使 **遺物中から本発明に用いるタンパク質を中継粘製するこ** 単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記塔 ラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマ 的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグ ルマトリックスを用いることで容易に分離できる。ま 後、ヒスチジンタグを付与したRCはN1-NTAを担持したゲ 用するホモジナイザーなどを用いることができる。その 菌体を破砕することにより抽出することができる。菌体 トグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を 【0023】培養後、菌体内に生産されたタンパク質は タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学

特開2001-83155

9

【0024】2、表面プラズモン共鳴測定用チップの製

面プラズモン共鳴測定用チップは、以下のようにして製 した光合成反応中心タンパク質8を有する。本発明の表 イオン6を介して、ヒスチジンタグ7によって配位結合 を有するチップ基板5と、ニトリロトリ酢酸にニッケル す。本発明の測定用チップは、表面にニトリロトリ酢酸 本発明の一例による測定チップの断面概略図を図 3 に示

の、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れたレ ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなど 法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、 の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ 介在層の厚さは、5~50Åであるのが好ましい。金属膜 てもよい。クロム等からなる介在層を設ける場合、その 明基板と金属膜との間にクロム等からなる介在層を設け 好ましい。さらに、透明基板への付着性を考慮して、透 000Åであるのが好ましく、特に200~600Åであるのが ウム、白金等が挙げられる。金属膜2の膜厚は、100~2 が生じ得るようなもの、例えば、金、銀、銅、アルミニ 形成に用いる金属の種類としては、表面プラズモン共鳴 としては、0.1~20mm和技が好ましい。また、金属版の ーザー光透過製ものが好ましく、また、透明基板の厚さ 用いることができる透明基板の素材としては、ガラス、 えば、まず、透明基板上に金属膜を形成する。ここで、 **プ基板は必要に応じて自分で作製することもできる。例** ができる。また、表面にニトリロトリ件檄を有するチッ ンサーチップ(ビアコア社)等の市販のものを用いること ニトリロトリ酢酸を有するチップ基板としては、NTAセ リロトリ酢酸を有するチップ基板が必要である。表面に 本発明の測定用チップを製造するためには、表面にニト 【0025】(1) ニトリロトリ酢酸を有するチップ基板 30 5 23

後、化学結合法によってニトリロトリ酢酸を固定化する 分子を川いるセルフアッセンブル法や、金属販表面にニ ロトリ酢酸層は、チオール基を有するニトリロトリ酢酸 金属膜表面にニトリロトリ酢酸層を形成させる。ニトリ 方法方法等によって形成することが可能である。 トリロトリ酢酸と反応し得る化学物質層を形成させた 【0026】(2) チップ基板上へのヒスチジンタグRCタ 6

いで同様に、ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパ 装着して一定流量のニッケルイオン溶液を所定時間流 基板を装着する表面プラズモン共鳴測定装置がフローセ 固定化方法は常法によって行えばよく、例えば、チップ チジンタグRCタンパク質を固定化する。該タンパク質の 表面にニトリロトリ酢酸を有するチップ基板上へ、ヒス ク質を流すことによって、ニッケルイオンを介する形 **ル型のものである場合、まず、該装置に測定用チップを** ニッケルイオンをニトリロトリ酢酸に固定する。 · * 50

> で、ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパク質を基 板上に固定化し、本が別の測定用チップを得ることがで

【0027】3、本発明の表面プラズモン共鳴測定用チ

概要を以下に示す。まず、本発明の測定用チップをSPR 入光する。検出器10では、反射光12の強度を検出す れた金属膜で反射したその反射光12が、検出器10に が照射され(入射光11)、測定用チップ13に設けら からは、湖辺川チップ13の透明八板に向かって平句光 とを含む試料液を流路17を通して流す。次いで光源9 設置する。次いで、夾雑物質15及び測定対象物質16 なわち、測定チップ13は、透明基板が上になるように 測定装置に装着する。装着後の様子を図5に示した。す 製BIACORE X)を用いることによって、トリアジン系除草 ップを装着した市販のSPR測定装置(例えば、ビアコア社 上記 2 において作製された表面プラズモン共鳴測定用チ

面プラズモン共鳴が生じる人射角θが変化する。従っ 度が低下する。ここで、表面プラズモンの波数は、金属 て、反射光強度曲線の谷のずれによって、測定対象物質 ンドとの相互作用により媒質の同折率が変化すると、表 め、測定対象物質と測定用チップ上に固定化されたリガ 膜表面のごく近くにある媒質の屈折率の影響を受けるた 表面プラズモンを励起するために使用され、反射光の強 数が一致すると共鳴が起こり、光のエネルギーの一部が モンといわれる表面波が生じる。この2つの表面波の波 といわれる表面波が生じ、一方、金属膜にも表面プラズ 界面で全反射するときに、その界面にエバネッセント波

量は共鳴シグナルといわれ、10'。の変化を1 RUとして の濃度の変化を検知することができる。入射角のの変化

[0029]

る。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるもので 【火施例】以下、本発明を火施例により具体的に説明す

l II、BamHIで挟まれる173bpの領域のDNA合成を行っ hue, T. J., Varga, A. R., and Kaplan, S. (1989) J. 遺伝子を含むプラスミドpRHBL404[Sockett, R.E., Dono 一を以下のようにして構築した。まず、Hサブユニット ヒスチジンタグRCタンパク質を発現させるためのベクタ (I)ヒスチジンタグRCタンパク質発現ベクターの構築 ブクローニングした。これをpUR716とした。次いで、Bg |を用いてpuhA構造遺伝子を含む遺伝子断片をpUC19へサ Bacteriology171, 436-446]より、制限酵素Pstl、BanH 〔実施例1〕ヒスチジンタグRCタンパク質の調製

ップを用いるトリアジン系除草剤の測定

【0028】光が測定用チップ13の透明基板と外との

無電解めっき法等によって行うことができる。次いで、

含ませるようにDNAをデザインした。まず、以下の配列 た。終始コドンの前に 6 残具のヒスチジンコドンCACを

69

特開2001-83155

を有する鋳型長鎖DNAとPCA用短鎖DNAを化学合成した。 * *【0030】

gcgcggcccgcggggggccgcgccatgcggggatcagtggtggtggtggtggtgg-3'(配列番号16) agtcggtcgtggcggcgatgctggccgaatacgcccaccaccaccaccaccact-3(配列番号 1 5) 長鎖プライマー2:5′-ggatccgggtggggggggatctgatccggatcgggtccgggaaggatgcg 長鎖プライマー1:5′-agatctgcggctacgtcgccggcggcctgatgtatgccgcgcagccgaagcgca

[0031]

短鎖プライマー 2:5'-ggatccgggtgggggggggga-3'(配列番号 18) 知識[プライマー 1:5' -agatctgcggctacgtcgcc-3' (配列番号 17)

amHIまでの2本鎖DNA断片を完全化した。PCRは以下の条 ら数計した。これらを混合し、PCRにより、Bgl IIからB 鎖プライマー2、短鎖プライマー2はアンチセンス鎖か 長鎖プライマー 1、短鎖プライマー 1 はセンス鎖から長

件で行った。 [0032] (反応条件)

95°C、3分

95°C、1分(*)

72℃、4分(**) *から**までを30サイケル

72°C、15分

綴さた、同じへHindIII、BamHによった的磨した浴場へ 造遺伝子はHtndH11、BamH1にて切断することによって分 ー下流へと接続した。ベクターpCHB500HPは大阪大学理 (1992) J. Bacteriology 174, 2352-2360]のプロモータ クターpCHB500HP[Benning, C. and C. R. Somerville って、C末端にヒスチジン6残基を有するHサブユニッ イティブ遺伝子を除去したpUR716に接続した。これによ で末端を切断し、同じくBgl II、BamHIにて切断し、 ト遺伝子が構築できた。この組み換えHサブユニット構 【0033】完全化した2本鎖DNA断片はBg1 II、BamH ₩ ఆ

学部の佐伯和彦講師より譲り受けたものである。これに ドpCHT919(図6)が完成した。 よって組み換えHサブユニット構造遺伝子発現プラスミ

【0034】(2) ヒスチジンタグRCタンパク質生産構

上記(1)において構築したヒスチジンタグRCタンパク質

発現プラスミドは、Sockettらの方法[文献名:Sockett. 端にヒスチジンタグを持つNCタンパク質を発現する株を を添加したASY培地で増殖可能なHサブユニットのC末 子導入した。次いで、カナマイシン、テトラサイクリン デスPUHA1に、エレクトロポレーション法によって遺伝 際したHサブユニット欠損株ロドバクター・スフェロイ S. (1989) J. Bacter1ology 171, 436-446]によって構 R. E., Donohue, T. J., Varga, A. R., andKaplan,

【0035】(3) ヒスチジンタグRCタンパク質の生産及

上記(3)において得られた株をASY培地を用い、30℃、

に再懸濁した。菌体をDNアーゼ、マグネシウム存在下で 0)、100mM NaC1)に懸濶して再び集菌し、バッファー 10,000×gで集菌し、バッファー1(10 mM Tris(pH 8. うに希釈した。濃度0.5 % LDAO、終濃度5 mMイミダゾー より未破砕菌体を分離した。RCを含む光合成膜(クロマ レフンチアフスにて破砕し、10,000×g、30分の遠ふに 嫌気、光照射条件下で72時間培養した。得られた菌体を トホア腰)の上清は吸光度(850 nm)が50以下になるよ

ル、バッファー2(10 mM Tris (pH 8.0)、0.1 % LDAO

20 (N.N-dimethyl-dodecylamineN-oxide))にて平衡化したN り得た。 タンパク質をバッファー3(10 mll Tris (pll 8.0)、0.1 れなくなるまで、洗浄した。次いで、ヒスチジンタグRC ムに充填し、バッファー2にて溶出液の吸光度が認めら 4°Cにて30分間、撹拌処理した。処理後の懸濁液はカラ ファロースCL-6B(Quiagen社製))を上沿に加え、暗所、 1-NTAレジン(N1-NTAを高密度に表面に担持させてあるセ % LDAO、40 mHイミダゾール)にて溶出させることによ

【0036】 (火施例2) 分子.識別桌子のチップへのド

40 ローディングし、図4のような結合によってチップ表面 TAセンサーチップを、表面プラズモン共鳴(SPR) 測定装 衡液(pH 8.0)を流速20μ1/分で2分間を3回ローディン 50mMNaCl、0.2%(w/v)Triton X-100を含む50mMリン酸緩 ニトリロトリ酢酸(NTA)を結合したデキストラン層を持 を有する9mm×9mm、厚さ50nmの金層とその上に100nmの に固定化した。ここで、固定されていない余分なヒスチ 光合成反応中心タンパク質溶液を流速10μ1/分で3分間 ルイオンを配位させた。次いで、0.3μ Νヒスチジンタグ に装着した。この測定装置の測定セルに,500μM NiClz 置BIACORE X(ビアコア社製)のカートリッジブロック上 固定化用チップとして、表面にニトリロトリ酢酸(NTA) した。このようにして、趙定川チップを作製した。 を流速20μ1/分で測定セルに流し込むことにより洗い流 %(w/v)Triton X-100を含む50mMリン酸緩衝液(pH 8.0) ジンタグ光合成反応中心タンパク質は、50mM NaC1.0.2 グすることによりチップ表面のニトリロトリ酢酸ニッケ ONTAセンサーチップ(ビアコア社製)を用いた。 実施例1において調製した光合成反応中心タンパク質の

50 【0037】〔実施例3〕本発明の測定用チップを用い

たトリアジン系除草剤の測定

火魔例 2 において製造した測定川チップを川いて、トリアジン系除草剤の1つであるアトラジンの測定した。光白成反応中心タンパク質を固定した測定チップを装着した測定セルに、0.01、0.1、1、10、又は100 ng/ml に 希釈したアトラジンを流速 5 μ1/分で10分間流しながら を図7に示した。図7に示すように、試料濃度を共鳴シ 光強度を測定し、共鳴シグナル(RII)を求めた。この結果 グナルとの間には、正比例に数収した右ハ i上がりの関係* SEQUENCE LISTING

わかった。

[0038]

り、トリアジン系除草剤を高感度で測定することができ 【発明の効果】本発明の測定用チップを用いることによ

and Technology; Jun Wiyake; Chikashi Nakamura

<110> Koji Kajimura, Director-General of Agency of Industrial Science

<120> Photosynthetic reaction center protein immobilized chip for herbicide detection

<130> 117F0094

<210> 1

<220> <221> CDS <222> (1)...(780)

atg gtt ggt gtg act gct ttt gga aac ttc gat ctg gcg tcg Net Val Gly Val Thr Ala Phe Gly Asn Phe Asp Leu Ala Ser ctg gcg

96

144

CCB Pro gcc Ala gcg aac cag ggc ccg ttc ccg ctg ccg aag ccc aag acc ttc Ala Asn Gln Gly Pro Phe Pro Leu Pro Lys Pro Lys Thr Phe 55

atc ctg Ile Leu 65 ccc cac ggc cgc ggc acg ctg acc Pro His Gly Arg Gly Thr Leu Thr 70

240

* が見られた。これにより、本発明の測定用チップを用い るこちによりアトラジン量を測定することできることが

. DA 【配列表】

<160> 16

<211> 783

<212> DNA <213> Rhodobacter sphaeroides

48

atc tat Ile Tyr age the 188 are the etc geg age eng are tac tac etc eag Ser Phe Trp Ile Phe Leu Ala Cly Leu Ile Tyr Tyr Leu Gin 20 25

gag Glu aac Asn 35 c atg cgc gag : n Met Arg Glu g ggc tat ccg ctg g u Gly Tyr Pro Leu (g gag aac gag gac g u Glu Asn Glu Asp G 45 ggc acc Gly Thr

acc Thr

192

cc gtg ccc ggc ccg gaa agc hr Val Pro Gly Pro Glu Ser 75 80 cg gcc gtc tcg gaa ggc ttc hr Ala Val Ser Glu Gly Phe

gac Asp cgg ccg atc gcg ctc gcg cgg acg gcc gtc tcg Arg Pro 11e Ala Leu Ala Arg Thr Ala Val Ser 85 90 288

cat gcg ccc acg ggc gac ccg atg aag gac ggc gtc ggc ccg gcc 336

ccg

Pro His Ala Pro Thr Gly Asp Pro Met Lys Asp Gly Val Gly Pro Ala 105 110

aac aag atc aag ccg atg aag gcc gct gcc ggc ttc cac gtc tcg Asn Lys Ile Lys Pro Met Lys Ala Ala Ala Gly Phe His Val Ser tog tgg gtt gcg cgc cgt gac ctg ccc gaa ctc gac Ser Trp Val Ala Arg Arg Asp Leu Pro Glu Leu Asp 115 61y 125 g cac ggc cac y His Gly His gcc Ala 384 432

ggc aag aac ccg a Gly Lys Asn Pro 1 gcg ggc aag gtc gtg gac atc tgg gtc gac atc ccc gag cag atg gcc Ala Gly Lys Val Val Asp lle Trp Val Asp lle Pro Glu Gln Met Ala 165 170 175 Ιle atc e Gly Leu Pro gtc cgc ggc tgc gat ctc gag atc Val Arg Gly Cys Asp Leu Glu Ile 155 528 480

cgc tic ctc gag gtc gaa ctc aag gac ggc tcg acc cgc ctc ctg ccg Arg Phe Leu Glu Val Glu Leu Lys Asp Gly Ser Thr Arg Leu Leu Pro 180 185 190 576

atg cag atg gtc aag gtc cag tcg aac cgc gtt cat gtg aac gcg Wet Gin Wet Val Lys Val Gin Ser Asn Arg Val His Val Asn Ala 195 200 ctc Leu 624

gtc acg ctc ctc gaa gag g Val Thr Leu Leu Glu Glu A 225 230 tog toc gac cig tic gog ggc aic cog acg aic aag toc cog Ser Ser Asp Leu Phe Ala Gly Ile Pro Thr Ile Lys Ser Pro 210 220 gac aag atc tgc ggc tac gtc gcc ggc Asp Lys 11e Cys Gly Tyr Val Ala Gly 235 acc Thr 61y gag Clu 672 720

ctg atg tat gcc gcg ccg aag cgc aag tcg gtc gtg gcg gcg atg ctg Leu Met Tyr Ala Ala Pro Lys Arg Lys Ser Val Val Ala Ala Met Leu $245 \hspace{1.5cm} 255$ 768

gcc gaa tac gcc tga Ala Glu Tyr Ala 260

783

⟨210⟩

<211> 260 <212> PRT <213> Rhodobacter sphaeroides

Met Val Gly Val Glu Asp Arg Pro Ile Ala Leu Ala Arg Thr Ala Val Ser Glu Gly Phe Pro Ala Ala Asn Gln Gly Pro Phe Pro Leu Pro Lys Pro Lys Thr Phe Thr Glu Asn Met Arg Glu Gly Tyr Pro Leu Glu Asn Glu Asp Gly Thr lle Tyr Ser Phe Trp lle Phe Leu Ala Gly Leu lle Tyr Tyr Leu Gln Leu Pro His Gly Arg Gly Thr Leu 70 Thr Ala Phe Gly Asn Phe Asp Leu Ala Ser Leu Ala 55 Thr Val Pro Gly Pro Glu Ser 75 80

8

特開2001-83155

特開2001-83155

9

15

210 215 220 Val Thr Leu Leu Glu Glu Asp Lys lie Cys Gly Tyr Val Ala Gly Gly 225 230 236 145
150
Ala Gly Lys Val Val Asp Ile Trp Val Asp Ile Pro Glu Gln
165
170 Met Gin Met Val Lys Val Gin Ser Asn Arg Val His Val Asn Ala Leu Asn Pro Leu Net Tyr Ala Ala Pro Lys Arg Lys Ser Val Val Ala Ala Net Leu 245 250 255 Arg Phe Leu Glu Val Glu Leu Lys Asp Gly Ser Thr Arg Leu Leu Pro Gly Lys Asn Pro Ile Gly Leu Pro Val Arg Gly Cys Asp Leu Glu Ile Ser Trp Val Ala Arg Arg Asp Leu Pro Glu Leu Asp Gly His Gly His Lys IIe Lys Pro Met Lys Ala Ala Ala Gly Phe His Val Ser Ala 130 135 140 His Ala Pro Thr Cly Asp Pro Met Lys Asp Cly Val Cly Pro Ala 100 105 110 98 160 n Met Ala 175 95

Ala Glu Tyr Ala 260

<210> 3 <211> 801 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

ine. <223> A gene endcoding the subunit H which was tagged with oligo-histid

<221> CDS <222> (1)..(798)

acc gag aac Thr Glu Asn 35 atg gtt ggt gtg act gct ttt 8ga aac ttc gat ctg gcg tcg ctg gcg Wet Val Gly Val Thr Ala Phe Gly Asn Phe Asp Leu Ala Ser Leu Ala 1 15 10 15 atc tat agc ttc tgg atc ttc ctc gcg ggc ctg atc tac tac ctc cag Ile Tyr Ser Phe Trp Ile Phe Leu Ala Gly Leu Ile Tyr Tyr Leu Gln 20 25 Pro gec geg aac cag ggc ceg tte ceg ctg ceg aag cec aag acc tte Ala Ala Asn Gln Gly Pro Phe Pro Leu Pro Lys Pro Lys Thr Phe 50 60 atg cgc gag ggc tat ccg ctg gag aac gag gac ggc acc Met Arg Glu Gly Tyr Pro Leu Glu Asn Glu Asp Gly Thr 40 96 48 192 144

> atc ctg ccc cac ggc of the Leu Pro His Gly / 65 tcg tcc gac ctg ttc gcg ggc atc ccg acg atc aag tcc ccg acc Ser Ser Asp Leu Phe Ala Gly lle Pro Thr lle Lys Ser Pro Thr 210 215 220 atg cag atg gtc aag gtc cag tcg aac cgc gtt cat gtg aac gcg ctc Wet Gin Wet Val Lys Val Gin Ser Asn Arg Val His Val Asn Ala Leu 195 200 205 cgc ttc ctc gag gtc gaa ctc aag gac ggc tcg acc cgc ctc ctg ccg Arg Phe Leu Glu Val Glu Leu Lys Asp Gly Ser Thr Arg Leu Leu Pro 180 190 gog ggc aag gtc gtg gac atc tgg gtc gac atc ccc gag cag atg gcc Ala Gly Lys Val Val Asp Ile Trp Val Asp Ile Pro Glu Gln Wet Ala 165 170 ggc aag aac ccg atc ggc ctg ccc Gly Lys Asn Pro Ile Gly Leu Pro 145 aac aag atc aag ccg atg aag gcc gct gcc ggc ttc cac gtc tcg gcc Asn lys Ile Lys Pro Wet Lys Ala Ala Ala Gly Phe His Val Ser Ala 130 135 tcg tgg gtt gcg cgc cgt gac Ser Trp Val Ala Arg Arg Asp ccg Pro gaa gac cgg ccg atc gcg ctc gcg cgg Glu Asp Arg Pro Ile Ala Leu Ala Arg ctg atg tat gcc gcg ccg aag cgc aag tcg gtc Leu Met Tyr Ala Ala Pro Lys Arg Lys Ser Val 245 gtc acg ctc ctc gaa gag gac aag atc tgc ggc tac Val Thr Leu Leu Glu Glu Asp Lys Ile Cys Gly Tyr 225 230 g cat gcg ccc acg g g ggc gac ccg atg a ur Gly Asp Pro Net 1 105 cgc Arg 70 t gac ctg g Asp Leu 120 ccc Pro gtc Val gg acg gcc gtc tcg; gg Thr Ala Val Ser; 90 c cgc ggc tgc l Arg Gly Cys 155 c gaa ctc gac aag Lys g gac ggc gtc s Asp Gly Val gtg ccc Val Pro 75 c gtg gcg gcg atg ctg l Val Ala Ala Met Leu 255 c gat ctc gag atc s Asp Leu Glu Ile 160 c ggg cac ggc cac p Gly His Gly His 125 gtc Val c ggc ccg gcc 1 Gly Pro Ala 110 g gaa ggc ttc c Glu Gly Phe gcc ggc Ala Gly gaa agc Glu Ser 80 Gly Gly 828 61u 288 768 672 624 576 528 480 432 384 336 720

(211) 266 PRT

<213> Artificial Sequence

⟨210⟩

gcc gaa tac gcc cac cac cac cac cac cac cac tga Ala Glu Tyr Ala His His His His His His His 260 265

801

<223> Oligo-histidine tagged subunit H

Met Val Gly Val Thr Ala Phe Gly Asn Phe Asp Leu Ala Ser Leu Ala

<u>=</u>

s ggc acg g Gly Thr

ctg Leu

acc Thr

ggc ccg

240

特開2001-83155

Gly Lys Asn Pro Ile Gly Leu Pro Val Arg Gly Cys Asp Leu Glu Ile 145 150 155 160 Ala Gly Lys Val Val Asp Ile Trp Val Asp Ile Pro Glu Gln Net Ala 165 170 175 Ala Val 225 Ser Wet Cln Wet Val Lys Val Gln Ser Asn Arg Val His Val Asn Ala Leu 195 200 205 Pro His Ala Pro Thr Gly Asp Pro lle Leu Pro His Gly Arg Gly Thr Leu Thr Vai Pro
65 70 75
Glu Asp Arg Pro Ile Ala Leu Ala Arg Thr Ala Val Pro Arg Phe Leu Glu Val Glu Leu Lys Asp Gly Ser Thr Arg Leu Leu Pro 180 190 Asn Lys IIe Lys Pro Met Lys Ala Ala Ala Gly Phe His Val Ser Ala Ser 1 He Tyr Ser Phe Trp He Phe Leu 210 . I Thr Leu Leu Glu (e Leu Pro His Gly Arg Gly Thr Leu Thr Val Pro Gly Pro Glu Ser 5 70 75 80 u Asp Arg Pro Ile Ala Leu Ala Arg Thr Ala Val Ser Glu Gly Phe 85 90 95 o His Ala Pro Thr Gly Asp Pro Met Lys Asp Gly Val Gly Pro Ala ∩ Glu Asn Ser Asp Leu Phe Ala Gly Ile Pro Thr Ile Lys Ser Pro Thr Glu Trp Val Ala Arg Arg Asp Leu Ala Ala Asn Gln Gly Pro Phe Pro Leu Pro Lys Pro Lys Thr Phe 50 55 60 Met Arg Glu Gly Tyr Pro Leu Glu Asn Giu Asp Lys Ile Cys Gly Tyr Vai Ala Gly Gly 230 235 240 Met Lys Asp Gly Val 105 Ala 25 Pro Glu Leu Asp 15
La Gly Leu Ile Tyr Tyr Leu Gln
25
0 Leu Gln Arr '' ' 46 Gly Hts Gly His Glu Asp Gly Thr

<220> <221> CDS <222> (1)..(846) atg gca ctg ctc agc ttc gag cga aaa tat cgc gtg Net Ala Leu Leu Ser Phe Glu Arg Lys Tyr Arg Val 1 5 ctg Leu gtc Val 61y 20 gga aac Asn age tte gag ega aaa tat ege gtg eeg ggg ege aeg 'Ser Phe Glu Arg Lys Tyr Arg Val Pro Gly Gly Thr 5 10 15
aaa etg tte gac tte tgg gte gge eet tte tat gte San Leu Phe Asp Phe Trp Val Gly Pro Phe Tyr Val 25 96

<212> DNA <210> 5 <211> 849

<213> Rhodobacter sphaeroides

tat gcc ttc ccc tac ggg atc tgg acg cac ctc gac tgg gtg tcg aac
Tyr Ala Phe Pro Tyr Gly lie Trp Thr His Leu Asp Trp Val Ser Asn
145
150
160
acg ggc tac acc tac aggc aac ttc cac tac aac cct gcc cac atg atc
Thr Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe His Tyr Asn Pro Ala His Wet Ile
165
170
gcc atc tcg ttc ttc acg aac gcg ctg gct clg gcg ctg cac ggc
Ala lie Ser Phe Phe Phe Thr Asn Ala Leu Ala Leu Ala Leu His Gly
180
185 atc tct gtc tac c lle Ser Val Tyr P 65 ctc gca aaa ggc g Leu Ala Lys Gly (ctg att gcc tgg agt : Leu Ile Ala Trp Ser . tgg gcg aac i Trp Ala Asn 275 gcc ttc gtc a atc ggg acg ctc Ile Gly Thr Leu 8gc atc 8gg tac cac atc ccg ttc Gly Ile Gly Tyr His Ile Pro Phe 115 ggc ttc ttc p Gly Phe Phe (tac cig acg cig gig cig itc cgc ccg gig atg atg 8gc Tyr Leu Thr Leu Val Leu Phe Arg Pro Val Met Met Gly 130 135 140 c ctt gtg ctc | a Leu Val Leu : 195 c gat cag e Asp GIn gtc ttc ttc a 3 ccg gat cac gag gat acg ttc ttc cgc gat ctg gtc ggc tac tcg Pro Asp His Glu Asp Thr Phe Phe Arg Asp Leu Val Gly Tyr Ser 210 220 atc ccg agc tgg gcg ctg cgc Ser Trp Ala Leu Arg drl 883 100 ctc ggc atc cac cgc ctc ggc ctg ctg ctc tcg ctg ago
Leu Gly lle His Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Leu Ser
230
235
246
ttc agc gcc ctc tgc atg atc att acc ggc acc atc tgg
Phe Ser Ala Leu Cys Wet lle Ile Thr Gly Thr Ile Tr
245
250
255 c tcc gcg gcc aac o w Ser Ala Ala Asn I 200 gete gac tgg tgg caa tgg tgg gtg Val Asp Trp Trp Gln Trp Trp Val 265 Gly 85 ccg Pro gtt Val cg gga ggc atc aat ggc tga ro Gly Gly lle Asn Gly 280 g ccg gcc ctt o Pro Ala Leu 70 t gcc gta r Ala Val ctg tgg cag atc atc acg atc tgc Leu Trp Gln Ile Ile Thr Ile Cys gcg Ala acg ctc Leu ttt Phe 40 c cag ggt acc tgg a u Gln Gly Thr Trp / 60 t ttc ttc gcg g Phe Phe Ala / gcc ttc gcg ttc gcc atc ctg gcc Ala Phe Ala Phe Ala Ile Leu Ala 125 gaa gtc gaa atc tgc cgt aag ctg Glu Val Glu Ile Cys Arg Lys Leu 105 ccc Pro 01u c gag aag ggc aag g ro Glu Lys Gly Lys (205 tat Tyr ggc ctg Gly Leu 75 gcc ctg Ala Leu 45 240

Ex ggc acc atc tgg

If Gly Thr Ile Trp

255

Ig aag ctg ccg tgg

Il lys Leu Pro Trp gga ggt gca ccc Gly Gly Ala Pro aac ccc Asn Pro ʒgaaatgo sGluMet √5 80 c gcc act ggt s Ala Thr Gly 95 g gtg tcg aac o Val Ser Asn gcc tgg | Ala Trp | ggt atc att i Gly Ile Ile 270 Gln Leu caa ctc Arg ggc Gly atc Gly Gly agc Ser IIe 160 816 720 672 624 576 528 480 432 384 336 288 240 192 849 768

<210> 6

特開2001-83155

144

(2)

特開2001-83155 24

(3)

<211> 282 <212> PRT <213> Rhodobacter sphaeroides 23 282 PRT

130
135
Tyr Ala Phe Pro Tyr Gly 11e Trp Thr His Leu Asp Trp Val Ser Asn
145
150
160
Thr Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe His Tyr Asn Pro Ala His Net 11e
175
170
175 lie Gly Thr Leu Gly Ile His Arg Leu Gly Leu Leu Ser Leu Ser 225 $$230\,$ $$\sim^-$ 50
Ile Ser Val Tyr Pro Pro Ala Leu Glu Tyr Gly Leu Gly Gly Ala Pro
65
70
75
80
Leu Ala Lys Gly Gly Leu Trp Gln Ile Ile Thr Ile Gys Ala Thr Gly
95
95 Tyr Leu Ala Ile Ser Phe Phe Phe Thr Asn Ala Leu Ala Leu Gly lle Gly Tyr His lle Pro Phe Ala Phe Ala Phe Ala Ile Leu Ala Ala Phe Val Ser Trp Ala Leu Arg Glu Val Glu Ile Cys Arg Lys Leu 100 110 Leu Ile Ala Trp Ser Ala Val Leu Gin Gly Thr 50 55 Gly Phe Phe Gly Val Ala Thr Phe Phe Phe Ala Ala 35 40 Leu · Val Gly Gly Asn Leu Phe Asp Asp Val Pro Asp His Glu Asp Thr Phe Phe Arg Asp Leu Val Gly Tyr Ser 210 220 180 185 190 Leu Val Leu Ser Ala Ala Asm Pro Glu Lys Gly Lys Glu Wet Arg Ala Leu Leu Ser Phe Glu Arg 245 240
245 250 245
250 255
26 In Trp Val Asp Trp Trp Gin Trp Val Lys Leu Pro Trp
260 265 Thr Leu Val Leu Phe Arg Pro Val Net Met Gly Ala Trp Gly Phe 25 Lys Tyr Arg Val Pro Gly Gly Thr Trp Val Gly Pro Phe Tyr Val Įτρ a Leu Gly Ile Ile 45 Asn Pro Gln Leu ı Hıs Gly

886 8886 ctg t886 ctg atc gcg tcg ttc ttc atg ttc gtc gcg gtc tgg
Gly Gly Leu Trp Leu IIe Ala Ser Phe Phe Net Phe Val Ala Val Trp
115 120 125
tcc t88 t88 sgc cgc acc tat ctc cgc gct cag gcg ctg 88c atg ggc
Ser Trp Trp Gly Arg Thr Tyr Leu Arg Ala Gln Ala Leu Gly Net Gly
130 135 140
aag cac acc gcc t88 gcg ttc ctc tcg gcc atc tgg ctg tgg atg gtg
Lys His Thr Ala Trp Ala Phe Leu Ser Ala IIe Trp Leu Trp Met Val
145 150 150 155 8gc ccg atc tat ctc ggc tcg ct Gly Pro Ile Tyr Leu Gly Ser Le 50 55 ccc tac ggc atc ttc tcg cac ctc gac tgg aca acc ttc tcg ctc gac tgg acac ttc tcg ctc gac tgg acac ttc tcg ctc spro Tyr Cly lie Phe Ser His Leu Asp Trp Thr Asn Asn Phe Ser Leu 180
185
186
170
187
188
188
188 gcc gac ctg ggg a Ala Asp Leu Gly 1 ttc ctc tac ggg tcg p Phe Leu Tyr Gly Ser / 210 tgg aac ccg gcc | Trp Asn Pro Ala atg gct gag tat Wet Ala Glu Tyr I gtc Val ctg Leu ccg ccg gca ccc gaa tac ggt ctg tcc ttc gcg gct ccg ctg aag gaa Pro Pro Ala Pro Glu Tyr Gly Leu Ser Phe Ala Ala Pro Leu Lys Glu 100 105 ctg atg tgg ttc ttc acc atc ggg atc tgg ttc tgg tat cag gcg Leu Wet Trp Phe Phe Thr Ile Gly lle Trp Phe Trp Tyr Gln Ala 65 70 75 gtc Val ac cgc ggg acg gca g sp Arg Gly Thr Ala / 245 cc gcg gtc tcc cgc ttc gu Ala Val Ser Arg Phe (230 tc ggt ccc ttc tcg a al Gly Pro Phe Ser 1 35 c cac ggc aac o g atg acc gaa p y Wet Thr Glu / gtc ttc ctg cgc gac ctg ttc ttc ttc Val Phe Leu Arg Asp Leu Phe Phe Phe 85 ctg Leu cag Gin 5 a gcg gag cgg g a Ala Glu Arg / g ttc tac aac u Phe Tyr Asn 200 g acc ctg Thr Leu g aac atc ttc n Asn lle Phe gcc ctg ctc ttc gcg atg cac ggt Ala Leu Leu Phe Ala Met His Cly 215 220 c ggc ggc e Gly Gly ctc Leu gac Asp ctc Leu 40 gcc Ala gag Glu ccc Pro Gly ggc Gly gtc Val 25 tcc Ser o Phe His Gly Leu Ser | 205 gc gtc ctg tcc ctc t y Val Leu Ser Leu F 60 c gcc ctc ttc | a Ala Leu Phe 1 250 g cgc gag ctg g u Arg Glu Leu (235 c aac ctg gcc. l Asn Leu Ala. cag Gln IO ttc Phe gtc Val ggc Gly cag Gln Trp 88 gag Glu aac Asn 45 aac Asn gtc Val g cgc tgg acc p Arg Trp Thr 255 gcc Ala cag Gln gcg Ala tcg Phe Arg GE C cgc Arg g acc atc a Thr He atc · Ile g ctc gag r Leu Glu cag Gln tcg Ser c gga ccg g Gly Pro 15 atc tcg 95 Gly 80 G gg Ctc Gly Gly gcc Ala gcc Ala 48 768 720 672 624 576 528 480 432 384 336 288 240 144 96 192

⟨210⟩

Trp

Ala Asn Ile Pro Gly Gly Ile Asn Gly 275 280

<211> 927 <212> DNA <213> Rhodobacter sphaeroides

<220> <221> CDS <222> (1)... . (924)

(15) 特開2001-83155

29

(16)

特開2001-83155

絽

<211> 308 <212> PRT <213> Rhodobacter sphaeroides gcg ccg ctg aac tga Ala Pro Leu Asn 305 200 205
Phe Leu Tyr Gly Ser Ala Leu Leu Phe Ala Met His Gly Ala Thr Ile
210 215 220
Leu Ala Val Ser Aro Pho Clo Clo Clo Lys His Thr Ala Trp Ala Phe Leu Ser Ala IIe Trp Leu Trp Met Val 145 150 160 Leu Gly Phe IIe Arg Pro IIe Leu Met Gly Ser Trp Ser Glu Ala Val 175 176 177 Leu Met Trp Phe Phe Thr Ile Gly Ile Trp Phe Trp Tyr Gln Ala Gly 65 70 75 80

Trp Asn Pro Ala Val Phe Leu Arg Asp Leu Phe Phe Phe Ser Leu Glu 95 atg 88t ttc aac gcc acg atg gaa 8gc atc cac cgc tgg gcc atc tgg Wet Gly Phe Asn Ala Thr Net Glu Gly 11e H1s Arg Trp Ala 11e Trp 260 265 270 235 240 Asp Arg Gly Thr Ala Ala Glu Arg Ala Ala Leu Phe Trp Arg Trp Thr <210> 8 ggc acg gtc głg gac aac tgg tac gtc tgg ggc cag aac cac ggc atg Gly Thr Val Val Asp Asn Trp Tyr Val Trp Gly Gln Asn His Gly Met 290 295 300Leu Ala Val Ser Arg Phe Gly Gly Glu Arg Glu Leu Glu Gln Ile Ala 225 230 240 Val His Gly Asn Leu Phe Tyr Asn Pro Phe His Gly Leu Ser Ile Ala Pro Tyr Gly Ile Phe Ser His Leu Asp Trp Thr Asn Asn Phe Ser Leu Ser Trp Trp Gly Arg Thr Tyr Leu Arg Ala Gln Ala Leu Gly Met Gly Gly Gly Leu Trp Leu lle Ala Ser Phe Phe Met Phe Val Ala Val Trp 115 120 125 Pro Pro Ala Pro Glu Tyr Gly Leu Ser Phe Ala Ala Pro Leu Lys Glu $100 \hspace{1cm} 105 \hspace{1cm} 110 \hspace{1cm}$ Gly Pro IIe Tyr Leu Gly Ser Leu Gly Val Leu Ser Leu Phe Ser Gly $50 \\ 55$ Val Gly Pro Phe Ser Thr Leu Leu Gly Trp Phe Gly Asn Ala Gln Leu 35 40 atg gcg gtc ctc gtg acc ctc acc ggc ggc atc ggc atc ctg ctc tcg Wet Ala Val Leu Val Thr Leu Thr Gly Gly Ile Gly Ile Leu Leu Ser 275 280 285 Ala Asp Leu Gly Met Thr Glu Asp Val Asn Leu Ala Asn Arg Ser Gly Met Ala Glu Tyr Gln Asn Ile Phe Ser Gln Val Gln Val Arg Gly Pro 185 28 816 912 864 927

<220> <223> synthetic DNA <220> <223> synthetic DNA <210> 10 <211> 20 <212> DNA Ala Pro Leu Asn 305 <210> 11 <211> 20 <212> DNA <210> 9 <211> 20 Gly Thr Val Val Asp Asn Trp Tyr Val Trp Gly Gln Asn His Gly Met 290 295 300 245 250 255

Met Gly Phe Asn Ala Thr Met Glu Gly He His Arg Trp Ala Lie Trp
260 265 270 <212> DNA <210> 12 <211> 20 <400> 10 <212> DNA Met Ala Val Leu Val Thr Leu Thr Gly Gly 11e Gly 11e Leu Leu Ser $275 \hspace{1cm} 280 \hspace{1cm} 285$ tcaggcgtat tcggccagca <213> Artificial Sequence atggitggig igacigcitt <213> Artificial Sequence atggcactgc tcagcttcga <400> 11 <213> Artificial Sequence <223> synthetic DNA 20 20 20

<213> Artificial Sequence

<223> synthetic DNA

<400> 16 \$Baiccgggt \$BBBBBBBBB tctgatccgg atcggttccg \$BBBBBBBCc gcgccatgcg gggatcagtg gtggtggtgg tggtgg	<223> synthetic DNA	<220>	<213> Artificial Sequence	<211> 106	<210> 16	tggcggcgat gctggccgaa tacgcccacc accaccacca ccact	<400> 15	vees synthetic nun	(220)	<213> Artificial Sequence	<212> DNA	(211) 105	<210> 15	tcagttcagc ggcgccatgc	<400> 14	<223> synthetic DNA	<220>	<213> Artificial Sequence	<212> DNA	<210> 14 <211> 20	argerger arcagaacar	<400> 13	<223> synthetic DNA	<220>	<213> Artificial Sequence	<211> 20 <212> DNA	<210> 13	<400> 12 tcagccattg atgcctcccg	:	쓰
 (400) 16 BBalcogggt BBBBBBBBB totgatocgg atogggtocg ggaaggatge ggogeggcc 60 gcggggggc gcgccatgcg gggatcagtg gtggtggtgg tggtgg 100 						tggcggcgat getggccgaa tacgcccacc accaccacca ccact	otaa tatataccac accaaaacac aaatca																							(17)
3ccc 60 106						105	stog AN							20							20	3						20	;	特開2001-83155 32
のチップ基板への結合メカニズムを示した図である。	である。 【図4】ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパク質	【図3】本発明のヒスチジンタゲ付き光合成反応中心タンパク質を固定作した表面プラズモン共鳴測定用チップ	を示した図である。	【図2】ネイティブな光舎成反応中心タンパク質のロド 40パカケー・スフェロイデスの細胞職表面トでの存在状態	M図には「MARSAの数型//<トノに過程式に))/)を 発図心める。	1111111111111111111111111111111111111	配列番号 1.7:合成DNA 紀列本 2.1 8:合成DNA	配列番号16:合成DNA	配列番号 1 4:合成DNA 配列聚是 1 5:今时NA	配列番号 1 2:合成DNA 配列番号 1 3:合成DNA		配列番号10:合成DNA	リニット 配列番号 9 :合成DNA	配列番号4:オリゴヒスチジンでタグ付けされたHサブ	【配列表ノリーアキスト】配列番号3:オリコとスナシ ンでタグ付けされたHサブユニットをコードする遺伝子	[0039]	Seatcoppet peppagga	ZA00\ 10	<223> synthetic DNA	(220)	<213> Artificial Sequence	(211) 10 (212) 20	/210\ 10	agatotgogg otaogtogoo	7,007, 17	<220> <223> synthetic DNA	700 VITTLICATION	<211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sources	⟨210⟩ 17	33 (18)
		14・・リガンド 15・・來雑物館		- 11・・入射光 - 12・・反射光	10・検出器		6・・・ニッケルイオンフ・・・トスチジンタグ	•	3・・・多孔性材料	1・・・ガラス基板 2・・・金属膜		80	【図7】本発明の測定用ナップを教育した2kk装庫を用いてアトラジンを測定した場合の結果を示した図であ	発現ベクターの構造を示した図である。	ン共場測定装庫の概認図である。 【図6】ヒスチジンタグ付き光合成反応中心タンパク質	【図5】本党別の測定川チップを装着した表面プラズモ、共鳴地で共興で調へ配エキン	20							20					:	特開200183155 34

(72)発明者 三宅 淳 茨城県つくば市東!丁目1番4 工業技術院 産業技術融合領域研究所内 フロントページの続き PCHT918 [図3] [図] [図6] CACCACCACCACCACCAC RU [医4] (19) (72)発明者 中村 史 茨城県つくば市東1丁目1番4 工業技術 院 産業技術融合領域研究所内 Fターム(参考) 20059 AAOI CC20 DD03 DD13 EEO4 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 3 アトラジン選度(ng/ml) トコトリソ共存兵法 [図2] [図7] 特開2001-83155 【图5】